

高同型半胱氨酸型动脉粥样硬化大鼠主动脉 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 的表达

田佳, 张墨阳, 周忠义, 谢晓红

海南省人民医院重症医学科, 海南 海口 570010

摘要: **目的** 研究高同型半胱氨酸(Hhcy)型动脉粥样硬化(AS)大鼠主动脉含半胱氨酸天冬氨酸水解酶 3(Caspase 3)、Bax 及 Bcl-2 的表达。**方法** 20 只 SD 大鼠随机分为实验组及对照组, 实验组大鼠灌胃给予 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 蛋氨酸复制 Hhcy 型 AS 大鼠模型, 对照组大鼠给予等量生理盐水灌胃。饲养 4 个月后, 处死大鼠。采用全自动分析仪检测血清同型半胱氨酸(Hcy)含量, HE 染色检测主动脉斑块面积, 免疫组化检测主动脉组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SM-actin)表达, Western blot 及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法分别检测主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较, 实验组血清中 Hcy 含量显著提高, 主动脉斑块面积及 α -SM-actin 阳性表达率增加(P 均 < 0.01), 表明 Hhcy 型 AS 大鼠模型复制成功。与对照组比较, 实验组 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达上调, Bax 及 Caspase 3 蛋白及 mRNA 表达下调(P 均 < 0.01)。**结论** 蛋氨酸诱导的 Hhcy 型 AS 大鼠通过调节 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 表达影响其动脉硬化进程。

关键词: 同型半胱氨酸; 高同型半胱氨酸血症; 动脉粥样硬化; α -平滑肌肌动蛋白; 含半胱氨酸天冬氨酸水解酶 3; Bax; Bcl-2

中图分类号: R-33 R 543.1⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)07-0900-04

Expressions of Caspase 3, Bax and Bcl-2 in aorta of rats with type high homocysteine atherosclerosis

TIAN Jia, ZHANG Mo-yang, ZHOU Zhong-yi, XIE Xiao-hong

Department of Critical Care Medicine, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan 570010, China

Abstract: Objective To investigate the expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase 3), Bax and Bcl-2 in aorta of rats with type high homocysteine (Hhcy) atherosclerosis(AS). **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into experiment group and control group. Methionine ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was given by gavage in experiment group to establish type Hhcy AS model, and normal saline was given by gavage in control group. The rats were killed after 4 months of feeding. Full automatic analyzer was used to detect the content of serum homocysteine(Hcy). HE staining was used to detect the aortic plaque area. Immunohistochemistry method was used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SM-actin) in aortic tissue. Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used to respectively detect the expressions of Caspase 3, Bax and Bcl-2 protein and mRNA. **Results** It indicated the type Hhcy AS model was established successfully that the content of serum Hcy increased significantly, and the aortic plaque area and the α -SM-actin positive expression rate increased significantly (all $P < 0.01$) in experiment group compared with control group. Compared with control group, the protein and mRNA expressions of Bcl-2 were up-regulated, and the protein and mRNA expressions of Bax and Caspase 3 were down-regulated in experiment group (all $P < 0.01$). **Conclusion** The aortic AS progress in methionine-induced type Hhcy AS rats is affected through regulating the expressions of Caspase 3, Bax and Bcl-2.

Key words: Homocysteine; Hyperhomocysteinemia; Atherosclerosis; α -smooth muscle actin; Cysteinyl aspartate specific proteinase 3; Bax; Bcl-2

动脉粥样硬化(AS)是严重的心血管疾病之一, 严重危害人们健康与生命。AS 特点为受累动脉发生

病变, 从内膜开始发生脂质和糖类沉积, 中层血管平滑肌细胞(VSMC)增殖并向内膜迁移, 导致内膜增厚而形成粥样病灶或者纤维脂质斑块^[1-2]。AS 发病机制不明, 众多学者认为血管内皮细胞损伤、VSMC 增

生、炎症是导致 AS 高发的原因之一^[3-5],其中 VSMC 增殖与凋亡不平衡是 AS 发生、发展的中心环节。已有报道血清同型半胱氨酸(Hcy)是 AS 的独立危险因素,通过产生氧自由基而导致血管损伤、VSMC 过度增殖,从而诱发 AS^[6-9],而 Hcy 诱导的 AS 主动脉组织中半胱氨酸天冬氨酸水解酶 3(Caspase 3)、Bax 及 Bcl-2 的表达报道较少。本研究通过蛋氨酸复制 AS 大鼠模型,检测 AS 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 的表达,从而探讨 Hcy 对 AS 进展的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 20 只雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证(SCXK(沪)2012-0002)。室内温度控制在(23 ± 2)°C,大鼠自由饮食和饮水。

1.2 主要试剂与仪器 L-蛋氨酸购于美国 Sigma 公司;兔抗 Bax, Bcl-2, GADPH 抗体购自 Epitomics 公司;兔抗 Caspase 3 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SM-actin)单克隆抗体购自博士德生物有限公司;迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪购自北京六一仪器厂;ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司。

1.3 AS 模型制作^[9-10] 20 只 SD 大鼠随机分为对照组及实验组。实验组大鼠每天灌胃给予 1 g · kg⁻¹ · d⁻¹蛋氨酸制作高 Hcy(Hhey)型 AS 大鼠模型,对照组给予等量生理盐水,连续灌胃 4 个月,大鼠处死,胸主动脉取血用于 Hcy 检测,主动脉组织用于 HE 染色,免疫组化,Western blot 及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测。

1.4 血清中 Hcy 含量测定 用拜耳 ADVIA2400 全自动分析仪测定血清中 Hcy 含量。

1.5 HE 染色检测主动脉病理形态 部分主动脉组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片、烘干。二甲苯脱蜡,无水、95%、80%乙醇脱水,流水冲洗,苏木素浸泡,盐酸酒精浸泡,流水冲洗至反蓝,伊红复染,流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,吹干后中性树胶封片后镜检。用图形分析软件 Qwin 2.0 分析主动脉 HE 染色截面图,测定斑块面积占血管面积的百分比。

1.6 免疫组化测定主动脉中 α -SM-actin 表达 将主动脉切片进行脱蜡脱水,并流水冲洗,抗原修复,PBS 冲洗,一抗孵育,PBS 冲洗,二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L))孵育,PBS 洗涤,DAB 显色,苏木素复染后,脱水,透明,树胶封片进行镜检。PBS 代替一抗为阴性对照, α -SM-actin 阳性表达呈棕

黄色。

1.7 Western blot 检测主动脉组织中 Bax, Bcl-2 及 Caspase 3 蛋白表达 主动脉组织进行匀浆,并加入裂解液裂解,离心,获得蛋白样品。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样,跑 SDS 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗 4 °C 孵育过夜。次日加二抗孵育后曝光。用“Quantity one”对蛋白灰度值进行分析。

1.8 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测主动脉组织中 Bax, Bcl-2 及 Caspase 3 mRNA 表达 参考 trizol 试剂盒(Invitrogen)说明书提取总 RNA,并检测 RNA 纯度。通过一步法 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增,获取 5 μ l 扩增产物用于下一步 2% 的琼脂糖胶进行检测。引物分别加入 25 μ l PCR 反应体系中,反应条件为 94 °C 变性 45 s, 59 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环。引物如表 1。

表 1 RT-PCR 引物

基因	引物(5'-3')
Bax	前向(For): TGAACCGGCATACTGCACAC
	逆向(Rev): CGTCTTCAGAGACAGGCAGGAG
Bcl-2	For: TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG
	Rev: GTCCAGGCCCATGATGGTTCT
Caspase 3	For: GGCATGGAGAACACTGAAAC
	Rev: GCGAATCTGTTCTTTGTCATG
GADPH	For: AGCCACATCGCTCAGACA
	Rev: TGGACTCCACGACGTACT

1.9 统计学分析 数据通过 SPSS20.0 进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 Hcy 含量、主动脉斑块面积及 α -SM-actin 表达的检测 如表 2 所示,与对照组比较,实验组中 Hcy 浓度显著上升,斑块面积显著增加, α -SM-actin 蛋白阳性表达率也显著提高,差异均具有统计学意义(*P* 均 < 0.01),表明 Hhey AS 大鼠模型复制成功。

2.2 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达 如图 1,表 3 所示,与对照组比较,实验组中 Caspase 3 及 Bax 蛋白表达量显著降低,Bcl-2 蛋白表达量显著提高,差异均具有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。

2.3 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达情况 如图 2,表 4 所示,与对照组比较,实验组中 Caspase 3 及 Bax mRNA 表达量显著降低,Bcl-2 mRNA 表达量显著提高,差异均具有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。

表 2 两组血清中 Hcy 含量、主动脉斑块面积及 SM- α -actin 表达的检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Hcy 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	斑块面积 (mm^2)	α -SM-actin (%)
对照组	10	3.79 \pm 0.40	0.08 \pm 0.01	20.39 \pm 2.41
实验组	10	67.28 \pm 6.82 *	2.48 \pm 0.25 *	65.47 \pm 6.58 *

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

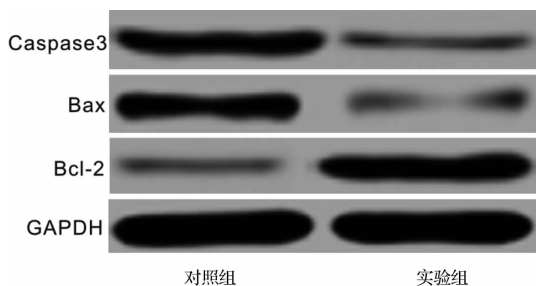


图 1 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达

表 3 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Caspase 3	Bax	Bcl-2
对照组	10	0.87 \pm 0.09	0.78 \pm 0.08	0.19 \pm 0.02
实验组	10	0.26 \pm 0.03 *	0.19 \pm 0.02 *	0.90 \pm 0.08 *

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

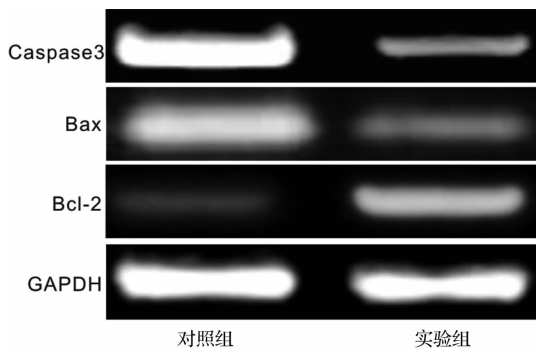


图 2 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达

表 4 主动脉组织中 Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Caspase 3	Bax	Bcl-2
对照组	10	0.96 \pm 0.09	0.69 \pm 0.07	0.14 \pm 0.01
实验组	10	0.23 \pm 0.02 *	0.18 \pm 0.02 *	0.60 \pm 0.06 *

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

3 讨论

Hcy 是一种在体内由蛋氨酸分解所产生的一个重要中间产物,是一种含硫非必需氨基酸。近年临床研究表明 Hhcy 与高血压、高血脂、糖尿病、肥胖、冠状动脉粥样硬化、脑血管疾病等存在密切相关性,后来又证实 Hcy 是 AS 一个独立的危险因素,但是其导致 AS 的发病机制尚未阐明^[6-9]。有研究报道,Hcy 可能通过损伤血管内皮,促进 VSMC 增殖,并促进机体氧化应激反应,促进炎症反应与免疫反应等过程^[6-9]。本研究通过蛋氨酸诱导大鼠复制 Hhcy AS

模型,发现其血清中 Hcy 含量显著提高,斑块面积增加,平滑肌细胞标记物 α -SM-actin 阳性表达率也显著提高,说明 AS 造模成功,同时蛋氨酸通过诱导 VSMC 过度增殖促进 AS 斑块的形成,与张政军等^[10]、鲍晓梅等^[11]观点一致。

已有研究证实 VSMC 增殖与凋亡失衡导致了 AS 斑块的产生,在 AS 损伤中 VSMC 增殖占据优势,细胞凋亡处于弱势^[10-11]。细胞凋亡由细胞凋亡基因严格调控。Bcl-2 家族研究最为广泛,在体内外细胞凋亡信号通路中起重要作用,涉及氧化应激或严重反应所导致的血管内皮细胞凋亡及 VSMC 过度增殖,其中 Bcl-2 是最常见的抑凋亡基因,在巨噬细胞、血管内皮细胞、VSMC 和泡沫细胞中均有表达,并在炎性细胞聚集的区域表达呈上调趋势。Bax 亦是启动细胞凋亡的必需信号,能够抵抗 Bcl-2 抗凋亡作用,促进细胞凋亡。当细胞内 Bcl-2/Bax 异二聚体含量增高,使得细胞凋亡减弱,而 Bax 同源二聚体增多时,细胞凋亡加强。有研究发现 AS 血管平滑肌细胞中 Bcl-2 过表达,能与 Bax 互相拮抗,调节平滑肌细胞增殖,从而导致斑块形成^[12-14]。Bagheri 等^[15]实验表明 Hhcy 血症小鼠脑组织中 Bax mRNA 表达量下调,而 Bcl-2 表达量上调。孙文萍等^[16]研究显示 Hcy 能显著诱导大鼠脑微血管内皮细胞凋亡,与下调 Bcl-2 表达,上调 Bax 表达有关,说明 Hcy 与细胞中 Bax 及 Bcl-2 表达密切相关。鲍晓梅等^[11]研究证实 Hcy 能显著的促进大鼠 VSMC 增殖及迁移,从而 AS 形成。我们通过 Western blot 及 RT-PCR 检测 AS 主动脉组织中 Bax 及 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 表达,结果表明实验组中 Bax 表达量下调,Bcl-2 表达量上调,与 HE 染色结果及免疫组化结果一致。蛋氨酸诱导的 AS 大鼠斑块形成, α -SM-actin 阳性表达量提高,是通过提高 Bcl-2 表达、抑制 Bax 表达实现的,与张政军等^[10]的结论一致。

Bcl-2/Bax 形成的异二聚体或 Bax 同源二聚体能够作用于线粒体外膜,从而影响线粒体释放 Caspase。Caspase 是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,能够激活凋亡信号通路,使细胞皱缩,并产生 DNA 片段等凋亡现象。Caspase 3 处于 Caspase 级联中下游,是细胞凋亡执行者。因此通过检测蛋氨酸诱导 AS 大鼠主动脉组织中 Caspase 3 表达,能反映 VSMC 的增殖程度。我们通过 Western blot 及 RT-PCR 法检测主动脉组织中 Caspase 3 蛋白及 mRNA 表达,结果表明实验组中 Caspase 3 蛋白及 mRNA 表达显著提高,与 Bax 表达趋势一致,从而说明蛋氨酸通过促进 Bax 表达,抑制 Bcl-2 表达,进而上调 Caspase 3 表达,从而

促进 AS 大鼠斑块形成及 VSMC 过度增殖。

参考文献

- [1] 林聪, 吴晓球, 邓可. 动脉粥样硬化的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(6): 975-977.
- [2] Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy [J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(3): 147-151.
- [3] Shah NR, Mahmoudi M. The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 86: 147-157.
- [4] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 272-276.
- [5] Zhang L, Yang L. Anti-inflammatory effects of vinpocetine in atherosclerosis and ischemic stroke: a review of the literature [J]. *Molecules*, 2015, 20(1): 335-347.
- [6] 侯丹丹, 甄攀攀, 王雯. 高同型半胱氨酸血症与内皮祖细胞凋亡[J]. 生理科学进展, 2011, 42(2): 158-160.
- [7] 刘会娟, 周春阳. 硫化氢和同型半胱氨酸在动脉粥样硬化病变中的研究现状[J]. 川北医学院学报, 2012, 27(6): 547-551.
- [8] 罗国刚, 韩建峰, 王琳, 等. 血浆同型半胱氨酸与缺血性脑血管病患者颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. 中国脑血管病杂志, 2012, 9(3): 123-127.
- [9] 沈伟强, 李政, 樊树峰, 等. 颈动脉粥样硬化的 MRI 临床研究现

状[J]. 中华全科医学, 2014, 12(6): 984-986.

- [10] 张政军, 贾绍斌, 侯建军, 等. 高同型半胱氨酸血症大鼠主动脉组织中 Bcl-2 和 Bax 基因的表达[J]. 广东医学, 2013, 34(8): 1160-1162.
- [11] 鲍晓梅, 郑宏超. 同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞增殖、迁移能力的影响及其可能机制[J]. 山东医药, 2015, 55(44): 25-27.
- [12] 庄秋红, 李譞, 赵学忠. 盐酸地尔硫卓对血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(10): 1820-1822.
- [13] 冯朝彩, 赵占胜, 李丹, 等. 波动性高糖对血管平滑肌细胞增殖及凋亡蛋白表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(11): 897-900.
- [14] Yang Z, Wang WE, Zhang Q. CIAPIN1 siRNA inhibits proliferation, migration and promotes apoptosis of VSMCs by regulating Bcl-2 and Bax [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2013, 10(1): 4-10.
- [15] Bagheri F, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 287: 215-225.
- [16] 孙文萍, 谢春香, 赵节绪. 同型半胱氨酸对 BMVECs 凋亡相关基因 BCL-2/BAX 表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(11): 985-988.

收稿日期: 2016-04-18 修回日期: 2016-05-20 编辑: 周永彬

(上接第 899 页)

- [6] Spyropoulou A, Gargalionis A, Dalagiorgou G, et al. Role of histone lysine methyltransferases SUV39H1 and SETDB1 in gliomagenesis: modulation of cell proliferation, migration, and colony formation [J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(1): 70-82.
- [7] Wong CM, Wei L, Law CT, et al. Up-regulation of histone methyltransferase SETDB1 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes cancer metastasis [J]. *Hepatology*, 2016, 63(2): 474-487.
- [8] Alagoz M, Katsuki Y, Ogiwara H, et al. SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(16): 7931-7944.
- [9] Thompson PJ, Dulberg V, Moon KM, et al. hnRNP K coordinates transcriptional silencing by SETDB1 in embryonic stem cells [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(1): e1004933.
- [10] Rodriguez-Paredes M, Martinez de Paz A, Simó-Riudalbas L, et al. Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2807-2813.
- [11] Zhang H, Cai K, Wang J, et al. MiR-7, inhibited indirectly by lin-

cRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(11): 2858-2868.

- [12] Nicolai S, Rossi A, Di Daniele N, et al. DNA repair and aging: the impact of the p53 family [J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(12): 1050-1065.
- [13] Li J, Bian EB, He XJ, et al. Epigenetic repression of long non-coding RNA MEG3 mediated by DNMT1 represses the p53 pathway in gliomas [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 723-733.
- [14] Sun QY, Ding LW, Xiao JF, et al. SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signalling pathway [J]. *J Pathol*, 2015, 235(4): 559-570.
- [15] Fei Q, Shang K, Zhang J, et al. Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8651.
- [16] Lindgren D, Sjödash G, Lauss M, et al. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38863.

收稿日期: 2016-02-16 修回日期: 2016-03-10 编辑: 王国品